

PRODUCTION OF MONO-AND OLIGOGALACTURONIC ACID**Publication number:** JP6205687**Publication date:** 1994-07-26**Inventor:** YAMAGUCHI SHINYA; ICHIDA JUNJI; HANAMATSU
NORIMITSU; MATSUE HAJIME**Applicant:** AOMORI PREFECTURE**Classification:****- international:** C12P19/14; C12P19/00; (IPC1-7): C12P19/14**- european:****Application number:** JP19920297598 19920629**Priority number(s):** JP19920297598 19920629**Report a data error here****Abstract of JP6205687****PURPOSE:** To efficiently mass-produce mono-and oligogalacturonic acid at a low cost.**CONSTITUTION:** A water-insoluble immobilizing carrier having an enzyme bound thereto is prepared and pectin or pectic acid is fed thereto under control of temperature to produce the objective mono-and oligogalacturonic acid.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-205687

(43) 公開日 平成6年(1994)7月26日

(51) Int.Cl.⁵
C 1 2 P 19/14

識別記号 庁内整理番号
Z 7432-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 3 頁)

(21) 出願番号 特願平4-297598

(22) 出願日 平成4年(1992)6月29日

(71) 出願人 591005453

青森県

青森県青森市長島1丁目1番1号

(72) 発明者 山口 信哉

青森県青森市大字八ツ役字芦谷202の4

青森県産業技術開発センター内

(72) 発明者 市田 淳治

青森県青森市大字八ツ役字芦谷202の4

青森県産業技術開発センター内

(72) 発明者 花松 憲光

青森県青森市大字八ツ役字芦谷202の4

青森県産業技術開発センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノ及びオリゴガラクトロン酸の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 モノ及びオリゴガラクトロン酸を効率よく安価にかつ大量に製造する方法。

【構成】 酵素を結合させた水不溶性固定化担体を用意し、温度制御下で、ペクチン、又はペクチン酸を流加させることにより製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項】 酵素を結合させた水不溶性固定化担体によるペクチン、又はペクチン酸からモノ及びオリゴガラクトン酸の製造方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はペクチン、ペクチン酸分解酵素を水不溶性固定化担体に結合させ、原料としてペクチン、又はペクチン酸を流加させることによってモノ及びオリゴガラクトン酸を効率よく安価にかつ大量に製造する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 近年、オリゴガラクトン酸は大腸菌などの細菌作用や植物の対微生物防御反応に関するエリシター因子として働き、農作物の収量が增大する可能性が示唆されている物質である。しかし、オリゴガラクトン酸の製造法にはいろいろな方法があるが、いずれも煩雑な操作と長時間を要し、かつ大量製造に不向きであるという欠点があった。即ちその一つはバッチ式でペクチン、又はペクチン酸に各種微生物由来の酵素を作用させることにより、モノ及びオリゴガラクトン酸を製造していた。しかし、一般に、微生物が分泌する酵素の量はわずかであり、この製造方法においては、バッチ式で酵素反応を行うため酵素は使い捨てであり、モノ及びオリゴガラクトン酸の製造量が増すほど酵素を多量に消費することになり、効率的ではない。又、大量に酵素反応を行うほど反応条件が不均一になりやすく、製造したモノ及びオリゴガラクトン酸も不均一になりやすい。故に、従来の方法は生産的でなく、特に大量製造に適さないという欠点があった。

【0003】

【発明が解決しようとする問題点】 そこで本発明の目的は前記の欠点を除き、大量生産に適しかつ効率的なモノ及びオリゴガラクトン酸の製造方法を提供することにある。

【0004】

【問題点を解決するための手段】 本発明者らは種々検討工夫した結果、ペクチン、ペクチン酸分解酵素を水不溶性固定化担体に結合させそれにペクチン、又はペクチン酸を流加することによりモノ及びオリゴガラクトン酸を効率よく大量に製造できることを発見し本発明に至った。以下モノ及びオリゴガラクトン酸製造法についてその好ましい実施態様に基づき詳述する。

【0005】 原料として使用するペクチンは植物由来のものなら種類を問わず、又ペクチン酸は天然のものやペクチンを前処理して得たものなら同じく種類を問わない。ペクチン、ペクチン酸分解酵素はペクチンリアーゼ、ペクチン酸リアーゼ、又はポリガラクトナーゼやペクチンのエステルを加水分解するエステラーゼを用いる。これらの酵素は原料となるペクチン又はペクチン酸

と欲するモノ及びオリゴガラクトン酸によって使いわけるとよい。但しオリゴガラクトン酸を製造するためにはエキソ型の酵素は存在しないほうが好ましい。これらの酵素の固定化の方法は担体結合法、架橋法、包括法があるが、担体結合法のうちの酵素と担体の結合の強さが最も強い共有結合が扱いやすい。水不溶性固定化担体としては「CNBr-活性化Sephadex 4B」（商品名、ファルマシア社）、「アフィゲル」（商品名、バイオラッド社）等のアフィニティークロマト担体や「ダイヤイオンHP樹脂」（商品名、三菱化成（株））などの吸着樹脂、又は「キトパールBCW」（商品名、富士紡績（株））などのキトサンビーズなどが使用される。これらの水不溶性固定化担体にペクチン、又はペクチン酸分解酵素を結合させ、ウォータージャケット付きカラム又は温度制御可能な温室器内にてカラムに充填し、予め緩衝液に溶解したペクチン、又はペクチン酸を連続的に流加することによって、モノ及びオリゴガラクトン酸が得られる。緩衝液にペクチン、又はペクチン酸を溶解した方が酵素の安定性や耐久性のため良い。この際ペクチン、又はペクチン酸は難溶性なので1%以上の溶液は難しい。又、使用の前にはろし、不溶物を除去したほうがよい。緩衝液のpHを酵素に適pHにあわせることにより、より効率的な製造が期待できる。ペクチン、又はペクチン酸は酸性物質なので緩衝液は揮発性の酸、酢酸、炭酸を組み合わせた緩衝液が脱塩、精製のため好ましい。カラムから出た反応液を陽イオン交換樹脂に通し脱塩し、その後凍結乾燥することにより、モノ及びオリゴガラクトン酸が得られる。陽イオン交換樹脂を組み入れることにより、水不溶性固定化担体から漏れてた酵素も同時に捕捉される。ペクチン、又はペクチン酸溶液をカラムに流加する速度、カラム内の温度やペクチン、ペクチン酸分解酵素の量を調整することにより、オリゴガラクトン酸の重合度構成分布を制御できる。このオリゴガラクトン酸の重合度構成分布は既知の方法のイオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーにより調べることができる。

【0006】 本発明の製造方法は従来の製造方法に比べて非常に簡単であり、経済的にかつ大量製造法に適している。従来製造法に比べて替わるのは明白である。

【0007】 次に実施例をあげ、本発明のモノ及びオリゴガラクトン酸の製造法を更に具体的に説明する。

【0008】 実施例1

【0009】 市販のペクチナーゼ（A. niger由来、フルカ社製）15mgを0.1MのHEPES緩衝液（pH7.5）中で水不溶性固定化担体アフィゲル10（商品名、日本バイオ・ラッドラボラトリーズ（株）製）1mlに共有結合させる。この酵素固定化担体をカラムに充填する。カラムのウォータージャケット内の水温を20℃に設定する。シトラスペクチン（シグマ製）

(3)

特開平6-205687

3

0.3%を0.01M酢酸緩衝液(pH4.5)に溶解し、ろ過する。このペクチン溶液をペリスターポンプでカラムの上から下へ連続的に0.1ml/分の流速で流加する。カラムを出た反応液を陽イオン交換樹脂AG50W(商品名、日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)製)に通し、脱塩する。この後、反応液を凍結乾燥することによりモノ及びオリゴガラクトロン酸を得る。この製造されたモノ及びオリゴガラクトロン酸を陰イオン交換クロマトグラフィーにより調べたところ、重合度の構成はモノマーが57%、ダイマーが11%、トリマーが10%、テトラマーが6%、ペンタマーが5%であった。

【0010】実施例2

【0011】担糸菌 *Stereum purpureum* を1%グルコースを含むジャガイモ煮汁培地で3週間培養しその培養ろ液から常法によりペクチン分解酵素を得る。この酵素400 μ gを0.1MのHEPES緩衝液(pH7.5)中で水不溶性固定化担体アフィゲル10(商品名、日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)製)8mlに結合させる。この酵素固定化担体をカラム

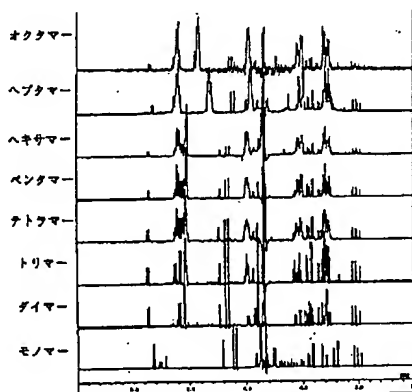
4

に充填する。カラムのウォータージャケット内の水温を10℃に設定する。ポリガラクトロン酸(シグマ製)0.3%を0.01M酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解し、ろ過する。このペクチン溶液をペリスターポンプでカラムの上から下へ連続的に0.5ml/分の流速で流加する。カラムを出た反応液を陽イオン交換樹脂AG50W(商品名、日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)製)に通し、脱塩する。この後、反応液を凍結乾燥することによりモノ及びオリゴガラクトロン酸を得る。この製造されたモノ及びオリゴガラクトロン酸を陰イオン交換クロマトグラフィーにより調べたところ、重合度の構成はモノマーが12%、ダイマーが16%、トリマーが18%、テトラマーが18%、ペンタマーが14%、ヘキサマーが10%、ヘプタマーが2%、オクタマーが1%であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】上記オリゴマーを1から8まで分画して、プロトン-NMR(270Mz)で測定した結果を示した図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 松江 一

青森県青森市大字八ツ役字芦谷202の4
青森県産業技術開発センター内